

of action, and impact on resistance selection. In this symposium, we will analyze the key pharmacokinetic properties of these compounds, addressing critical aspects such as plasma concentrations achieved, bioavailability of the different formulations, and factors that may affect their pharmacokinetics and, consequently, their clinical efficacy (Lifschitz et al., 2007; Sarli et al., 2024). Furthermore, we will discuss how prolonged or improper use of these molecules contributes to the rise of resistant populations. It is crucial to recognize that resistance development outpaces the generation of knowledge to counteract it, posing an ongoing challenge for the scientific community, veterinarians, and producers. The recent introduction of innovative molecules such as fluralaner represents a valuable opportunity but also demands a commitment to rational use. Integrating these new tools into integrated management strategies, including rotation of active ingredients, monitoring of tick population susceptibility, and non-pharmacological control measures, is essential for prolonging their efficacy and ensuring the sustainability of tick control programs over the long term.

Keywords: ivermectin; fluazuron; fluralaner.

Desde el campo al laboratorio: herramientas para el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina

From the field to the laboratory: tools for the diagnosis of bovine Babesiosis and Anaplasmosis

Pablo Parodi^{1*} y Mizaël Machado¹. *Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Plataforma de Investigación en Salud Animal. Estación Experimental INIA Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay.*

*pparodi@inia.org.uy

Los patógenos transmitidos por vectores representan una amenaza significativa tanto para la salud pública como para la salud animal (WHO, 2020). Las enfermedades transmitidas por vectores en bovinos, especialmente las garrapatas, son un problema grave para la producción ganadera mundial (WOAH, 2021a). Las garrapatas son, después de los mosquitos, los artrópodos vectores responsables de la mayor cantidad de enfermedades infecciosas (WHO, 2020; WOAH, 2021a). En Sudamérica, las principales enfermedades transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus microplus* a los bovinos son la babesiosis y la anaplasmosis, comúnmente conocidas como el complejo de tristeza parasitaria (TP) (Guglielmone, 1995). La babesiosis es causada por protozoarios del género *Babesia*, mientras que la anaplasmosis es provocada por la bacteria *Anaplasma marginale* (WOAH, 2021b; WOAH, 2015). En Sudamérica, las especies de *Babesia* de mayor importancia sanitaria son *B. bovis* y *B. bigemina* (*B. divergen* de importancia en el viejo mundo), ambas transmitidas por la garrapata *R. microplus*. En cambio, *A. marginale* puede ser transmitida por una variedad de vectores, tanto biológicos (garrapatas) como mecánicos (como moscas y tábanos) y de forma iatrogénica (Parodi et al., 2022; Solari et al., 2013). Estos parásitos se replican en los glóbulos rojos de los animales, lo que provoca anemia severa, fiebre, pérdida de peso y producción de leche, problemas reproductivos e incluso la muerte (Parodi et al., 2022). Las condiciones climáticas de Sudamérica influyen significativamente en la epidemiología de estas enfermedades, generando condiciones óptimas para los vectores, principalmente en verano y otoño, provocando aumento de brotes en estas estaciones (Parodi et al., 2022). A pesar de la alta prevalencia de babesiosis y anaplasmosis en Latinoamérica, muchos países enfrentan una inestabilidad enzoótica, lo que resulta en brotes recurrentes de diversa gravedad (Ferreira et al., 2022; Solari et al., 2013). En Uruguay, la situación varía según la región: la enfermedad es hiperendémica en el norte, endémica en el este y esporádica en el suroeste, lo que ocasiona pérdidas estimadas en más de 15.3 millones de dólares anualmente (Dutra et al., 2024). El

diagnóstico rápido y preciso es esencial para prevenir la mortalidad. El proceso diagnóstico puede dividirse en dos etapas: diagnóstico presuntivo y confirmatorio. El diagnóstico presuntivo se basa en la epidemiología (presencia de vectores, antecedentes de la enfermedad en el predio, etc.), el periodo de prepatencia de los hemoparásitos y la observación de signos clínicos tales como anemia, apatía, fiebre, ictericia y emaciación. Un signo clínico distintivo es la hemoglobinuria (orina color vino tinto), presente solo en la babesiosis aguda y la babesiosis nerviosa (causada por *B. bovis*), que presenta síntomas neurológicos como ataxia y ceguera (Riet-Correa et al., 2023; Parodi et al., 2022). Ambas enfermedades pueden causar abortos (Henker et al., 2020). Los hallazgos de autopsias son cruciales para orientar el diagnóstico. La babesiosis y la anaplasmosis pueden causar ictericia, esplenomegalia y hepatomegalia con patrón acinar evidente y palidez de la carcasa. En casos de babesiosis aguda, se observan riñones y orina de color rojo oscuro, indicativos de un cuadro hemolítico agudo. En la babesiosis nerviosa, la corteza cerebral muestra enrojecimiento difuso (Riet-Correa et al., 2023; Parodi et al., 2022). Suelen reportarse casos de babesiosis subaguda y crónica de las cuales son confundidas con otras enfermedades por no estar asociada a cuadros hemolíticos, pero sí con una forma anemizante (Gonzalez et al., 2024). En la babesiosis bovina, las principales lesiones histopatológicas están relacionadas con la anemia hemolítica, como la nefrosis hemoglobinúrica, necrosis hepática centrolobulillar o rándómica y colestasis canalicular (Riet-Correa et al., 2023). Es fundamental tener en cuenta enfermedades con signos clínicos similares al complejo de tristeza parasitaria para hacer un diagnóstico diferencial adecuado. Entre las enfermedades con características clínicas y patológicas similares están la hemoglobinuria bacilar, la leptospirosis aguda, intoxicaciones por plantas hepatotóxicas y cetosis bovina (Parodi, 2019; Solari et al., 2013). Estas semejanzas resaltan la importancia de la correcta recolección y conservación de muestras para realizar un diagnóstico confirmatorio. Las muestras deben ser tomadas de animales vivos y muertos y deben incluir sangre (en tubos con EDTA K⁺ y sin anticoagulante), bazo, hígado, riñones, corazón y cerebro. Estas muestras deben conservarse en fresco y en formol bufferado al 10% (Parodi, 2019). En el laboratorio, diversas técnicas pueden ser utilizadas para confirmar el diagnóstico. El método clásico implica la realización de frotis de sangre y órganos, coloreados con Giemsa, para la observación directa del parásito (Parodi et al., 2021; Solari et al., 2013). La cuantificación de parásitos es esencial para determinar la carga parasitaria, lo que ayuda a identificar animales infectados. En *B. bovis*, un 1% de eritrocitos parasitados es suficiente para confirmar la enfermedad, mientras que para *B. bigemina* y *A. marginale*, se requiere un umbral mayor al 5%. Además de los frotis, las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta moderna que ha demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad (>90%) para el diagnóstico de estas enfermedades (Parodi et al., 2021). También se han desarrollado tecnologías avanzadas, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), que tienen un gran potencial para su uso rutinario en campo (Arnuphapprasert et al., 2023; Lizarazo-Zuluaga et al., 2022). Por otro lado, las pruebas de detección de antígenos y los ensayos serológicos también juegan un papel importante. Entre las pruebas serológicas disponibles se encuentran la inmunofluorescencia indirecta y el Card Test, ambos usados para el diagnóstico de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. respectivamente (Araoz, 2019). Estas técnicas se han mejorado notablemente, y el uso de ELISA con antígenos recombinantes o "crudos" se ha implementado en varios países de la región (WOAH, 2021b; WOAH, 2015). En conclusión, un diagnóstico preciso de babesiosis y anaplasmosis puede lograrse combinando la información epidemiológica, los signos clínicos, los hallazgos patológicos y las pruebas de laboratorio adecuadas. La detección temprana y el tratamiento adecuado son fundamentales para mitigar las pérdidas económicas y mejorar la salud del ganado en las regiones afectadas.

Palabras claves: *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., diagnóstico, bovinos.

Vector-borne pathogens are a significant threat to public and animal health (WHO, 2020). Vector-borne diseases in cattle, especially those transmitted by ticks, are a serious issue for global livestock production (WOAH, 2021a). Ticks, after mosquitoes, are the arthropod vectors responsible for transmitting the most infectious diseases (WHO, 2020; WOA, 2021a). In South America, the main diseases transmitted by the tick *Rhipicephalus microplus* to cattle are babesiosis and anaplasmosis, commonly called bovine parasitic sickness complex (Guglielmo, 1995). Bovine babesiosis is caused by protozoa of the *Babesia* genus, while anaplasmosis is caused by the bacterium *Anaplasma marginale* (WOAH, 2021b; WOA, 2015). In South America, the most significant *Babesia* species affecting cattle are *B. bovis* and *B. bigemina* (*B. divergens* being important in the Old World), both transmitted by the tick *R. microplus*. On the other hand, *A. marginale* can be transmitted by a variety of vectors, both biological (ticks) and mechanical (such as flies and horseflies), as well as through iatrogenic means (Parodi et al., 2022; Solari et al., 2013). These parasites replicate within the red blood cells of the animals, causing severe anemia, fever, weight loss, reduced milk production, reproductive issues, and even death (Parodi et al., 2022). The climate conditions in South America significantly influence the epidemiology of these diseases, creating optimal conditions for vectors, particularly in the summer and autumn, leading to increased outbreaks during these seasons (Parodi et al., 2022). Despite the high prevalence of babesiosis and anaplasmosis in Latin America, many countries face enzootic instability, resulting in recurrent outbreaks of varying severity (Ferreira et al., 2022; Solari et al., 2013). In Uruguay, the situation varies by region: the disease is hyperendemic in the north, endemic in the east, and sporadic in the southwest, leading to estimated annual losses of over 15.3 million dollars (Dutra et al., 2024). Rapid and accurate diagnosis is essential to prevent mortality. The diagnostic process can be divided into two stages: presumptive and confirmatory diagnosis. Presumptive diagnosis is based on epidemiological factors (presence of vectors, history of the disease on the farm, etc.), the prepatent period of the parasites, and clinical signs such as anemia, lethargy, fever, jaundice, and emaciation. A distinctive clinical sign is hemoglobinuria (dark red urine), present only in acute babesiosis, and nervous babesiosis (caused by *B. bovis*), which presents neurological symptoms such as ataxia and blindness (Riet-Correa et al., 2023; Parodi et al., 2022). Both diseases can also cause abortions (Henker et al., 2020). Autopsy findings are crucial for guiding diagnosis. Babesiosis and anaplasmosis can cause jaundice, splenomegaly, and hepatomegaly with noticeable acinar patterns, and paleness of the carcass. In cases of acute babesiosis, dark red kidneys and urine are observed, indicative of an acute hemolytic condition. In nervous babesiosis, the cerebral cortex shows diffuse redness (Riet-Correa et al., 2023; Parodi et al., 2022). Cases of subacute and chronic babesiosis are often reported, which can be confused with other diseases because they are not associated with hemolytic conditions but rather with an anemic form (Gonzalez et al., 2024). In bovine babesiosis, the main histopathological lesions are related to hemolytic anemia, such as hemoglobinuric nephrosis, centrilobular or random hepatic necrosis, and canalicular cholestasis (Riet-Correa et al., 2023). It is essential to consider diseases with similar clinical signs to the bovine parasitic sickness complex to make an appropriate differential diagnosis. Diseases with similar clinical and pathological characteristics include bacillary hemoglobinuria, acute leptospirosis, intoxication by hepatotoxic plants, and bovine ketosis (Parodi, 2019; Solari et al., 2013). These similarities underscore the importance of proper sample collection and preservation to achieve a confirmatory diagnosis. Samples must be taken from both live and deceased animals and should include blood (in tubes with EDTA K⁺ and without anticoagulant), spleen, liver, kidneys, heart, and brain. These samples should be preserved fresh and in 10% buffered formalin (Parodi, 2019). In the laboratory, various techniques

can be used to confirm the diagnosis. The classical method involves blood and organ smears stained with Giemsa for the direct observation of the parasite (Parodi et al., 2021; Solari et al., 2013). Parasite quantification is essential to determine the parasitic load, which helps identify infected animals. For *B. bovis*, 1% of parasitized red blood cells is sufficient to confirm the disease, while for *B. bigemina* and *A. marginale*, a threshold greater than 5% is required. In addition to smears, Polymerase Chain Reaction (PCR) is a modern tool that has demonstrated high sensitivity and specificity (>90%) for diagnosing these diseases (Parodi et al., 2021). Advanced technologies, such as loop-mediated isothermal amplification (LAMP), have also been developed and show great potential for routine field use (Arnuphapprasert et al., 2023; Lizarazo-Zuluaga et al., 2022). Furthermore, antigen detection tests and serological assays also play an important role. Among the available serological tests are indirect immunofluorescence and the Card Test, both used for diagnosing *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., respectively (Araoz, 2019). These techniques have been significantly improved, and the use of ELISA with recombinant or "crude" antigens has been implemented in several countries in the region (WOAH, 2021b; WOAH, 2015). In conclusion, accurate diagnosis of babesiosis and anaplasmosis can be achieved by combining epidemiological information, clinical signs, pathological findings, and appropriate laboratory tests. Early detection and proper treatment are crucial for mitigating economic losses and improving cattle health in affected regions.

Keywords: *Babesia* spp, *Anaplasma* spp., diagnosis, bovine.

Araoz V. 2019. Estudio transversal de la garrapata común del bovino (*Rhipicephalus microplus*) y la tristeza parasitaria bovina en Uruguay. Tesis de Maestría. Facultad de Veterinaria, Montevideo-Uruguay.

Arnuphapprasert A, et al., 2023. Detection of *Babesia bovis* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with improved thermostability, sensitivity and alternative visualization methods. *Sci Rep.* 13(1):1838. doi: 10.1038/s41598-023-29066-1.

Dutra F. et al. 2024. Análisis retrospectivo de la tristeza parasitaria en Uruguay utilizando registros históricos de DILAVE "Miguel C. Rubino" (1977-2023). LI Jornadas Uruguayas de Buiatria. Pg 131-134.

Genetic diversity of *Anaplasma marginale*

Profa. Dra. Roangela Zacarias Machado. *Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal – UNESP.* rzacariasmachado@gmail.com

Anaplasma marginale belongs to the order Rickettsiales. Members of this order are small obligate intracellular bacteria with small genomes (1.2-1.6 Mb) (Brayton et al., 2005). The order Rickettsiales has been reorganized based on an analysis on the 16S rRNA, groESL and MSP genes, in which the organisms have been placed in two families: Anaplasmataceae and Rickettsiaceae (Dumler et al., 2001). Within the family Anaplasmataceae, phylogenetic analyses have identified four genetically distinct genera: *Anaplasma* with minimum similarity of 96.1%, *Ehrlichia* 97.7%, *Wolbachia* 95.6% and *Neorickettsia* 94.9% (Dumler et al., 2001). Currently, the genus *Anaplasma* includes six species: *Anaplasma marginale* (type species), *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys* and *Anaplasma phagocytophilum* (Dumler et al., 2001). The species *A. marginale*